桦木酸对环磷酰胺致小鼠免疫器官氧化损伤的保护作用

易想炼[1]　朱利娟[1,2*]　赵　静[1]　文利新[1,3]　BLAZEJ Pozniak[4]　罗晨曦[1]　黄淑贤[1]　邬静[1**]　易金娥[1,3**]

（1.湖南农业大学动物医学院，长沙 410128；2.长沙绿叶生物科技有限公司，长沙 410125；3.湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128；4.弗罗茨瓦夫环境与生命科学大学兽医学院，弗罗茨瓦夫 50-375,波兰）

摘　要：为了研究桦木酸（betulinic acid,BA）对环磷酰胺（cyclophosphamide,Cy)诱导小鼠免疫器官氧化损伤的影响。将50只健康雄性昆明小鼠随机分为5组，即对照组、Cy组及0.05、0.50、5.00 mg/kg BW BA组。对照组和Cy组灌服1%的可溶性淀粉溶液，其余各组按不同剂量的BA灌服，连续14 d后，除对照组注射生理盐水外，其余4组均腹腔注射Cy（50 mg/kg）诱导氧化应激模型。收集血清、脾脏和胸腺，检测血清中谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）活性及白蛋白（ALB）、总蛋白（TP）含量，检测脾脏和胸腺超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）活性及还原型谷胱甘肽（GSH）、丙二醛（MDA）含量。结果显示：1)对于体重，对照组与Cy组无显著差异（$P>0.05$），各剂量BA组与Cy组无显著差异（$P>0.05$）。2）与对照组相比，Cy极显著提高了血清AST、ALT活性（$P<0.05$），而5.00 mg/kg BW BA极显著缓解了这一现象（$P<0.05$）。3）与对照组相比，Cy引起了脾脏指数和胸腺指数的显著降低（$P<0.05$），而0.05 mg/kg BW BA显著缓解了胸腺指数的降低（$P<0.05$）。4）与对照组相比，Cy组胸腺SOD活性、胸腺CAT活性、脾脏GSH含量显著或极显著下降（$P<0.05$或$P<0.01$），脾脏MDA含量极显著升高（$P<0.01$）；与Cy组相比，0.50 mg/kg BW BA组显著或极显著提高了脾脏和胸腺GSH-Px和CAT活性及脾脏GSH含量（$P<0.05$或$P<0.01$），极显著降低脾脏MDA含量（$P<0.01$），但极显著降低了胸腺SOD活性（$P<0.01$）；与Cy组相比，5.00 mg/kg BW BA组显著或极显著提高了脾脏和胸

收稿日期：2017-09-

基金项目：湖南省科技计划项目(2015NK3008)；湖南省教育厅项目（17A098）；湖南省自然科学基金项目(2015JJ2077)

作者简介：易想炼（1993-），男，湖南长沙人，硕士研究生，从事营养代谢与动物保健研究。E-mail: 894874209@qq.com

*同等贡献作者

**通信作者：邬　静，副教授，硕士生导师，E-mail: 12145090@qq.com；易金娥，教授，硕士生导师，E-mail: yibinzhen@163.com

腺GSH-Px和CAT活性（P＜0.05或P＜0.01），极显著降低脾脏MDA含量（P＜0.01）。由此可见，BA能够改善Cy引起的小鼠免疫器官的氧化应激，对Cy诱导的氧化损伤有预防性的保护作用。

关键词：桦木酸；环磷酰胺；免疫器官；氧化应激

中图分类号：S816.7

自然界的很多天然活性物质能调控机体的氧化应激和免疫反应，保障机体细胞内外环境的稳定和生理机能正常。桦木酸（betulinic acid,BA）是一种植物源性五环三萜类物质，广泛存在于植物界，已有大量文章报道许多种属的植物中均有 BA[1]。BA 对正常细胞或机体具有保护作用，该保护作用可能与抗氧化应激和提高机体免疫力有关[2]。研究发现，BA 能激活小鼠腹腔巨噬细胞，提高其吞噬能力和能量代谢水平，增强机体抗氧化能力[3]；进一步研究发现，BA 对小鼠的细胞免疫、体液免疫和非特异免疫功能有显著的增强作用[4-5]。此外，BA 具有极低的毒性，当剂量高达 500 mg/kg 时，动物没有出现明显的中毒现象[4]，这些研究证实了 BA 可以作为抗氧化剂和免疫调节剂，在动物健康养殖方面具有广阔的应用前景[6]。

环磷酰胺（cyclophosphamide,Cy）为烷化剂类抗肿瘤药。它既是广谱抗肿瘤药，又是目前应用的各种免疫抑制剂中作用最强、应用最多的药物之一[7]。但 Cy 会引起机体骨髓抑制、脱发、白细胞减少和致畸等副作用[8]。研究表明，Cy 能够降低小鼠淋巴细胞数，使脾脏和淋巴结中 T 淋巴细胞 $CD25^+$、$CD4^+$数量和百分比显著减少[9]，表现出强大的免疫抑制作用，因此，Cy 常用作免疫抑制模型的建立[8]。同时，Cy 可促进组织氧化，释放更多的自由基，导致氧化损伤[3]，也被用作氧化应激模型的建立[10]。BA 是否对 Cy 引起的免疫器官氧化性损伤进而导致的免疫抑制具有改善或保护作用，还未见报道。本试验采用腹腔注射 Cy 诱导小鼠免疫器官氧化应激模型，研究 BA 对 Cy 导致免疫抑制的影响，旨在为 BA 的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

BA：以白桦树皮（2016 年春季收集于吉林省长春市，经 60 ℃烘干后贮藏在黑暗、干燥处备用）为原料，从白桦树皮中提取桦木醇，经琼斯试剂氧化制备中间产物桦木酮酸后，用硼氢化钠还原合成 BA，具体步骤按参考文献[11]，高效液相色谱（HPLC）测定 BA 纯度

为 96.53%。Cy：江苏恒瑞医药股份有限公司生产。

谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）活性及总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）含量测定试剂盒以及 BS-200 全自动生化分析仪均为深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司产品；超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）活性及还原型谷胱甘肽（GSH）、丙二醛（MDA）含量测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2　试验动物与饲料

50 只健康雄性昆明小鼠，4 周龄，无特定病原体（SPF）级，体质量为（20±2） g。饲料为小鼠普通育成料，由湖南斯莱克景达试验动物有限公司提供，其主要原料是小麦、玉米、豆油、麸皮、豆粕、鱼粉、麦芽糊精、酵母、草粉和预混料；主要营养水平（风干基础）如下：粗蛋白质（CP）20.50%、粗脂肪（EE）4.62%、钙（Ca）1.23%、磷（P）0.91%、赖氨酸（Lys）1.30%、蛋氨酸+半胱氨酸（Met+Cys）0.68%。

1.3　试验方法

将 50 只健康昆明小鼠放置在 21~25 ℃、相对湿度为 50%~70%的饲养房中饲养 1 周后，随机分为 5 组，即对照组、Cy 组及 0.05、0.50、5.00 mg/kg BW BA 组。将 BA 混悬于 1%的可溶性淀粉溶液中，按 0.01 mL/g BW 灌胃，对照组和 Cy 组给予等量的 1%可溶性淀粉溶液，1 次/d，连续灌胃 14 d。除对照组外，其余各组小鼠第 15 天开始连续 2 d 腹腔注射 Cy，建立氧化应激模型，对照组注射等量的生理盐水。禁食 16 h（自由饮水）后，眼眶采血扑杀，室温静止 2 h，3 000 r/min 离心 10 min，收集血清用于检测生化指标。无菌取脾脏和胸腺，称重，计算免疫器官指数，公式如下：

免疫器官指数=免疫器官/体重。

脾脏和胸腺与预冷生理盐水的质量体积比为 1：9 制成 10%组织匀浆，3 000 r/min 离心 15 min，收集上清液-80 ℃贮藏，用于检测 SOD、CAT、GSH-Px 活性及 GSH、MDA 含量。

1.4　检测指标

用全自动生化分析仪检测血清中 ALT 和 AST 的活性、TP 和 ALB 的含量。脾脏和胸腺 SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定；脾脏和胸腺 GSH-Px 活性采用二硫代二硝基苯甲酸（DTNB）法测定；脾脏和胸腺 MDA 含量采用硫代巴比妥酸显色法测定；脾脏和胸腺 GSH 含量采用 DTNB 法测定；脾脏和胸腺 CAT 活性采用钼酸铵比色法测定。SOD、CAT、GSH-Px

活性及 MDA、GSH 含量的检测均按试剂盒说明书严格操作。

1.5　数据统计分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析，采用 one-way ANOVA 程序进行方差分析，两两比较采用 *q* 检验，结果以平均值±标准差表示，采用 P＜0.05 为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　体重

BA 持续灌胃 14 d，小鼠未见明显异常，同时也没有发生伤亡现象，这说明 BA 对小鼠没有明显的毒性作用。由表 1 可见，与对照组相比，Cy 组小鼠体重没有显著变化（P>0.05）；与 Cy 组相比，各剂量 BA 组小鼠体重无显著变化（P>0.05）。

表1　桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠体重的影响

Table 1　Effects of betulinic acid on BW of oxidative stressed mice induced by Cy　　g

项目 Item	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
体重 BW	37.50±1.11	37.15±0.88	37.44±1.42	37.49±2.30	36.28±1.06

与对照组比较，a 表示差异显著（P<0.05），b 表示差异极显著（P<0.01）；与 Cy 组比较，c 表示差异显著（P<0.05），d 表示差异极显著（P<0.01）。下表同。

Compared with control group, a indicated significant difference (P<0.05), and b indicated extremely significant difference （P<0.01）; compared with Cy group, c indicated significant difference (P<0.05), and d indicated extremely significant difference （P<0.01）. The same as below.

2.2　血清生化指标

由表 2、表 3 可见，与对照组相比，Cy 组的血清 AST 和 ALT 活性极显著升高（P<0.01），血清 ALB 和 TP 含量基本没有变化（P>0.05）。与 Cy 组对比，5.00 mg/kg BW BA 组血清 ALT 和 AST 的活性极显著降低（P<0.01），而 ALB 和 TP 含量则无显著变化（P>0.05）。

表2　桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠血清酶活性的影响

Table 2　Effects of betulinic acid on serum enzyme activities of oxidative stressed mice induced by Cy　　U/L

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
谷丙转氨酶 ALT	54.76±10.30	75.97 ± 24.86^{b}	59.47±17.63	59.47±17.63	55.85 ± 6.10^{d}
谷草转氨酶 AST	195.70±40.93	251.64 ± 64.70^{b}	207.00±31.81	201.32±22.98	185.83 ± 27.15^{d}

表3　桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠血清蛋白质含量的影响

Table 3 Effects of betulinic acid on serum protein contents of oxidative stressed mice induced by Cy g/L

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
白蛋白 ALB	32.22±2.91	32.02±1.77	33.63±1.51	31.65±2.09	32.71±1.78
总蛋白 TP	64.76±4.17	64.23±3.54	68.22±2.9	64.57±3.88	64.22±3.53

2.3 免疫器官指数

由表 4 可见，与对照组相比，Cy 组小鼠脾脏指数和胸腺指数显著下降（P<0.05），说明 Cy 导致免疫器官萎缩。与 Cy 组相比，除 0.05 mg/kg BW BA 组胸腺指数显著提高（P<0.05）外，各剂量 BA 组免疫器官指数有提高趋势，但差异不显著（P>0.05）。

表4 桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠免疫器官指数的影响

Table 4 Effects of betulinic acid on immune organ indexes of oxidative stressed mice induced by Cy

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
脾脏指数 Spleen index	0.42±0.21	0.27±0.03^{a}	0.32±0.18	0.31±0.03	0.30±0.08
胸腺指数 Thymus index	0.27±0.05	0.21±0.03^{a}	0.25±0.05^{c}	0.22±0.06	0.24±0.04

2.4 脾脏和胸腺的 SOD 活性

由表 5 可见，与对照组相比，Cy 组胸腺 SOD 活性极显著降低（P＜0.01），而脾脏 SOD 活性无显著变化（P>0.05）。与 Cy 组相比，各剂量 BA 组胸腺 SOD 活性下降，且 0.50 mg/kg BW BA 组变化极显著（P＜0.01），而脾脏 SOD 活性无显著变化（P>0.05）。

表5 桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠脾脏和胸腺中SOD活性的影响

Table 5 Effects of betulinic acid on SOD activity in spleen and thymus of oxidative stressed mice induced by Cy

U/mg prot

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
脾脏 Spleen	88.00±7.30	89.71±10.21	92.29±7.44	89.25±6.97	88.85±5.91
胸腺 Thymus	563.90±56.56	399.33±47.65^{b}	397.29±69.53	285.60±35.84^{d}	343.25±48.23

2.5 脾脏和胸腺 GSH 含量

由表 6 可见，与对照组相比，Cy 组脾脏 GSH 含量显著下降（P＜0.05），而 0.50 mg/kg BW BA 组极显著高于 Cy 组（P＜0.01）。这说明 Cy 通过降低小鼠脾脏中 GSH 含量引起氧化损伤，而适当剂量 BA 处理能增强脾脏 GSH 含量，从而提高其抗氧化损伤的能力。

表6 桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠脾脏和胸腺中GSH含量的影响

Table 6 Effects of betulinic acid on GSH content in spleen and thymus of oxidative stressed mice induced by Cy

μ mol/L

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
脾脏 Spleen	26.58±6.31	17.36±4.92[a]	16.68±3.55	26.34±3.71[d]	17.92±2.27
胸腺 Thymus	6.72±1.52	7.58±1.69	7.89±0.66	6.75±1.46	7.26±0.18

2.6 脾脏和胸腺 GSH-Px 活性

由表 7 可见，与对照组相比，Cy 组脾脏和胸腺 GSH-Px 没有发生显著改变（P>0.05）。与 Cy 组相比，0.50 和 5.00 mg/kg BW BA 组脾脏和胸腺内 GSH-Px 活性显著或极显著升高（P<0.05 或 P<0.01）。这说明 BA 可以通过增强脾脏和胸腺 GSH-Px 活性来起到抗氧化损伤的作用。

表7 桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠脾脏和胸腺中GSH-Px活性的影响

Table 7 Effects of betulinic acid on GSH-Px activity in spleen and thymus of oxidative stressed mice induced by Cy U/mg prot

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
脾脏 Spleen	224.79±10.79	218.31±12.44	212.91±10.88	294.32±19.34[d]	297.13±7.52[d]
胸腺 Thymus	492.61±92.05	552.50±114.80	579.38±49.33	668.98±76.94[c]	891.05±141.93[d]

2.7 脾脏和胸腺 CAT 活性

由表 8 可见，与对照组相比，Cy 组脾脏和胸腺中 CAT 活性下降，且在胸腺中差异极显著（P＜0.01）。与 Cy 组相比，0.50 和 5.00 BW mg/kg BW BA 组脾脏和胸腺 CAT 活性显著或极显著提高（P＜0.01 或 P＜0.05）。这表明 BA 能改善 Cy 诱导后的小鼠脾脏和胸腺 CAT 活性，改善其抗氧化损伤的能力，对免疫器官起到一定保护作用。

表8 桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠脾脏和胸腺中CAT活性的影响

Table 8 Effects of betulinic acid on CAT activity in spleen and thymus of oxidative stressed mice induced by Cy U/mg prot

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
脾脏 Spleen	98.12±9.97	93.73±10.93	103.76±9.68	113.10±9.31[d]	108.71±8.02[c]
胸腺 Thymus	83.18±7.10	35.22±4.90[b]	33.17±11.22	103.77±10.19[d]	74.11±17.32[d]

2.8 脾脏和胸腺 MDA 含量

由表 9 可见，与对照组相比，Cy 组脾脏 MDA 含量极显著升高（P＜0.01）。与 Cy 组相

比，各剂量 BA 组脾脏 MDA 含量均极显著降低（$P<0.01$）。胸腺中 MDA 含量变化与脾脏相同，但变化不显著（$P>0.05$）。这表明 BA 可以通过降低脂质过氧化来缓解 Cy 对小鼠免疫器官的氧化损伤。

表9　桦木酸对环磷酰胺致氧化应激小鼠脾脏和胸腺中MDA含量的影响

Table 9　Effects of betulinic acid on MDA content in spleen and thymus of oxidative stressed mice induced by Cy　μ mol/L

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Cy	0.05 mg/kg BW BA	0.50 mg/kg BW BA	5.00 mg/kg BW BA
脾脏 Spleen	19.55 ± 2.78	26.13 ± 2.90^{b}	18.20 ± 1.95^{d}	17.85 ± 3.41^{d}	19.94 ± 3.90^{d}
胸腺 Thymus	21.70 ± 6.09	24.91 ± 5.66	20.40 ± 2.08	22.48 ± 1.97	18.19 ± 4.66

3　讨　论

Cy 是目前常用的一种烷化剂类抗肿瘤药物和细胞毒性药物，在体外无活性，进入体内被磷酰胺酶或磷酸酶水解，转化为有活性的磷酰胺氮芥，与 DNA 发生交叉联结，抑制 DNA 的合成，降低 DNA 的含量，从而影响机体的免疫水平[12-14]。Cy 作为免疫抑制剂可抑制各种动物的体液和细胞免疫应答[15]。周华等[16]研究证明，Cy 可使肠黏膜 Peyer’s 结内细胞数量和 $CD3^{+}$、免疫球蛋白 A 阳性（IgA^{+}）细胞减少，而细胞凋亡增强，说明 Cy 可以诱导肠黏膜免疫障碍。董晓芳等[17]研究发现，肉仔鸡 Cy 处理后 1 d，法氏囊指数、B 淋巴细胞增殖能力、法氏囊中白细胞介素 1β和脾脏、法氏囊中干扰素γ的 mRNA 表达量显著降低。王光等[8]研究也表明，超剂量 Cy 可严重损伤脾组织，并认为这种脾损伤可能与体内的氧化与抗氧化平衡被打破有关。本研究发现，腹腔注射大剂量 Cy 后，免疫器官中的抗氧化酶类（如 SOD、GSH-Px 和 CAT）活性和 GSH 含量大大降低，MDA 含量增加。这说明超剂量使用 Cy 后，抗氧化酶类被大量消耗，氧化还原平衡被打破，引起脂质过氧化，造成淋巴细胞损伤，最终导致氧化应激。本研究发现，Cy 处理后血清中 AST 和 ALT 活性极显著升高，说明在氧化应激的状态下，小鼠的肝脏受到了损伤。本试验还发现 Cy 引起免疫器官指数降低，导致免疫器官萎缩，说明 Cy 引起免疫器官氧化性损伤，进而导致免疫抑制。

BA 属于植物源性五环三萜类物质，具有抗炎、抗氧化应激和提高机体免疫力等多种生物活性[18]。体外研究发现，BA 可抑制肿瘤坏死因子引起的人脐静脉内皮细胞活性氧含量增加，达到保护血管的作用[19]。体内研究表明，BA 通过改善肝脏组织中的氧化还原体系，保护抗氧化系统，降低脂质过氧化作用，对酒精诱导肝脏损伤有预防性的保护作用[20-22]。本试

验结果发现，BA 处理后，显著降低了血清中 AST 和 ALT 的活性，说明 BA 对 Cy 引起的肝脏损伤具有保护作用。BA 处理后极显著缓解了 Cy 所致脾脏 GSH-Px、CAT 活性和 GSH 含量的降低，极显著减低了脾脏 MDA 的含量，显著或极显著提高了胸腺 GSH-Px 和 CAT 活性，表明 BA 对 Cy 引起的淋巴免疫器官氧化损伤具有保护作用。BA 的保护作用可能与自身的抗氧化性有关，通过提高抗氧化酶类的活性，降低脂质过氧化物的生成，缓解 Cy 引起的氧化应激。另据研究报道，BA 抑制角叉菜胶诱导胸膜炎小鼠的足爪组织中髓过氧化物酶的活性，其抑制率为 50.5%，增加足爪组织 GSH-Px 和谷胱甘肽还原酶的活性[23]，说明 BA 通过抑制炎性细胞浸润，提高机体抗氧化能力，从而达到抗炎提高机体免疫力的作用，本试验结果与此相似。值得注意的是，0.50 mg/kg BW BA 组胸腺 SOD 活性极显著低于 Cy 组，这说明 BA 不能通过调节 SOD 活性来缓解 Cy 对小鼠免疫器官造成的氧化损伤。本课题组前期研究发现，BA 处理后能显著提高地塞米松诱导氧化损伤小鼠淋巴细胞 SOD 活性[24]，本试验结果与此不一致，可能是诱导氧化应激的药物不一样所致。此外，BA 对 Cy 致免疫器官氧化损伤的保护作用可能与提高机体的免疫力相关。本研究发现，BA 能够增强免疫低下小鼠免疫应答能力，减轻 Cy 造成的胸腺萎缩，对免疫器官指数具有显著的修复作用。本课题组前期研究也发现，BA 增强淋巴细胞活性和改变 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的数目或亚群，从而提高机体的细胞免疫[25]。这说明 BA 提高抗氧化酶的活性，减少细胞内过氧化物，降低脂质过氧化，保护机体免受自由基的损伤，通过提高机体的抗氧化能力，从而提高机体的免疫力，证实了 BA 的免疫调节作用有赖于抗氧化应激能力的发挥。BA 具体的抗氧化应激机制尚有待于进一步研究。

4 结　论

BA 通过提高小鼠免疫器官 CAT、GSH-Px 活性和 GSH 含量、降低 MDA 含量，改善 Cy 引起的小鼠免疫器官的氧化应激，对 Cy 诱导的氧化损伤有预防性的保护作用。

参考文献：

[1] FUJIOKA T,KASHIWADA Y,KILKUSKIE R E,et al.Anti-AIDS agents,1 1.Betulinic acid and platonic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*,and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids[J].Journal of Natural Products,1994,57(2):243–247.

[2] 朱若岑,夏伟,谭柱良,等.桦木酸对 Dex 致小鼠氧化损伤的保护作用[J].中国兽医学报,2016,36(2):305–309.

[3] 邱静娟.俄罗斯人与白桦树[J].俄语学习,2000(2):45–47.

[4] 易金娥,邬静,文利新,等.桦木酸的药理作用研究进展[J].中草药,2014,45(14):2118–2124.

[5] PISAH E,CHAI H,LEE I S,et al.Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis[J].Nature Medicine,1995,1(10):1046–1051.

[6] CICHEWICZ R H,KOUZI S A.Chemistry,biological activity,and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection[J].Medicinal Research Reviews,2004,24(1):90–114.

[7] 韦凤华.环磷酰胺临床应用研究进展[J].中国药事,2013,27(3):324–326.

[8] 王光,潘江球,钟杰平,等.乌贼墨提取物对环磷酰胺致小鼠脾脏氧化性损伤的保护效应[J].食品科学,2009,30(11):219–222.

[9] 张秀娟,凌莉莉,季宇彬.桦木酸生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18(3):508–513.

[10] 吴皓,林洪生,裴迎霞,等.人参皂甙 Rg3 对荷瘤及环磷酰胺化疗小鼠黏膜免疫力影响[J].中国肿瘤,2006,15(6):369–371.

[11] ALAKURTTI S,MÄKELÄ T,KOSKIMIE S,et al.Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin[J].European Journal of Pharmaceutical Sciences,2006,29(1):1–13.

[12] TRIPATHI D N,JENA G B.Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage:a study in mice[J].Chemico-Biological Interactions,2009,180(3):398–406.

[13] OBOH G,AKOMOLAFE T L,ADEFEGHA S A,et al.Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds[J].Experimental and Toxicologic Pathology,2011,63(3):257–262.

[14] RAVID A,ROCKER D,MACHLENKIN A,et al.1,25-dihydroxyvitamin D_3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage[J].Cancer Research,1999,59(4):862–867.

[15] 赵弋清,罗霞,陈东辉,等.不同剂量环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的对比研究[J].免疫学杂志,2005,21(3):122–124.

[16] 周华,王培训,刘良,等.环磷酰胺对小鼠 Peyer’s 结和肠道黏膜相关淋巴细胞的影响[J].中国免疫学杂志,2000,17(4):186–187,189.

[17] 董晓芳,汪仕奎,萨仁娜,等.免疫抑制剂环磷酰胺对肉仔鸡生产性能及其内分泌的影响[J].畜牧兽医学报,2007,38(9):993–998.

[18] FULDA S,DEBATIN K M.Sensitization for anticancer drug induced apoptosis by betulinic acid[J].Neoplasia,2005,7(2):162–170.

[19] YOON J J,LEE Y J,KIM J S,et al.Protective role of betulinic acid on TNF-alpha-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2010,391(1):96–101.

[20] YI J N,XIA W,WU J P,et al.Betulinic acid prevents alcohol-induced liver damage by improving the antioxidant system in mice[J].Journal of Veterinary Science,2014,15(1):141–148.

[21] 袁莉芸,袁慧,陈铁桥.低剂量 T-2 毒素对雏鸡免疫器官及血清生化指标的影响[J].中国家禽,2007,29(17):14–16.

[22] 姜昕,刘密凤,林林,等.低剂量 T-2 毒素对大鼠血清生化指标的影响[J].中国地方病学杂志,2004,23(2):116–118.

[23] TSAI J C,PENG W H,CHIU T H,et al.Anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and betulinic acid[J].The American Journal of Chinese Medicine,2011,39(5):943–956.

[24] YI J,ZHU R C,WU J P,et al.*In vivo* protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress[J].Pharmacological Reports,2016,68(1):95–100.

[25] YI J E,OBMINSKA-MRUKOWICZ B,YUAN L Y,et al.Immunomodulatory effects of betulinic acid from the bark of white birch on mice[J].Journal of Veterinary Science,2010,11(4):305–313.

Protective Effects of Betulinic Acid on Immune Organs of Oxidative Damage Mice Induced by Cyclophosphamide

YI Xianglian[1] ZHU Lijuan[1,2*] ZHAO Jing[1] WEN Lixin[1,3] BLAZEJ Pozniak[4] LUO Chenxi[1] HUANG Shuxian[1] WU Jing[1**] YI Jin'e[1,3**]

(1. *College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*; 2. *Changsha Lvye Bio-Technology Co., Ltd., Changsha* 410125, *China; 3. Hunan Co-Innovation Center of Livestock Production Safety, Changsha* 410128, *China*; *4. Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wroclaw 50-375, Poland*)

Abstract: The objective of this research was to evaluate the effects of betulinic acid (BA) on immune organs of oxidative damaged mice induced by cyclophosphamide（Cy）. Fifty male healthy *Kunming* mice were randomly divided into 5 groups, which were control group, Cy group, and 0.05， 0.50 and 5.00 mg/kg BW BA groups. Control and Cy groups were administered orally with 1% starch solution, and the other groups were administered orally with different doses of BA for 14 days. Except control group, mice in the other groups were intraperitoneal injected Cy at the dosage of 50 mg/kg BW to set up oxidative damage model. Serum, spleen and thymus of mice were collected. Activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST), and contents of total protein (TP) and albumin (ALB) in serum, as well as activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalast (CAT), and contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in spleen and thymus were determined. The results showed as follows: 1) about body weight, control group and Cy group had no significant difference ($P>0.05$), and BA groups had no significant difference with Cy group ($P>0.05$). 2) Compared with control group, Cy significantly increased serum AST and ALT activities ($P<0.05$), and 0.05 mg/kg BW BA significantly relieved the effects of Cy ($P<0.05$). 3）Compared with

control group, Cy significantly decreased thymus index ($P<0.05$), and 0.05 mg/kg BW BA significantly relieved the effects of Cy ($P < 0.05$). 4） Compared with control group, Cy significantly decreased SOD and CAT activities in thymus, and GSH content in spleen （$P<0.05$ or $P<0.01$）, significantly increased spleen MDA content ($P<0.01$); compared with Cy group，0.05 mg/kg BW BA group had significantly higher GSH-Px and CAT activities in spleen and thymus（$P<0.05$ or $P<0.01$）, and significantly lower MDA content in spleen （$P<0.01$）, but had significantly lower SOD activity in thymus（$P<0.01$）; compared with Cy group，5.00 mg/kg BW BA group had significantly higher GSH-Px and CAT activities in spleen and thymus（$P<0.05$ or $P<0.01$）, and significantly lower MDA content in spleen （$P<0.01$）. The results suggest that BA can effectively improve oxidative stress of immune organs and shows preventive protection of oxidative damage in mice induced by Cy.

Key words： betulinic acid; cyclophosphamide; immune organ; oxidative stress

---

*Contributed equally

**Corresponding authors, WU Jing, professor, E-mail: yibinzhen@163.com; YI Jin'e, professor,E-mail: 12145090@qq.com （责任编辑 王智航）